取扱説明書

*本製品は研究用キットです。診断、治療目的には使用しないで下さい。
*右記 web 上に掲載しているプロトコールの最新版を確認のうえ操作して下さい。→http://ak-j.jp/

【測定原理】

本キットはキレート化合物を固定した固相抽出スピンカラムと発色試薬から構成されています。固相抽出樹脂に試料中の鉛（II）を結合させ、非特異物質を純水で洗浄後、硝酸により溶離、鉛（II）が濃縮されたアッセイ用検体を得ます。アッセイ検体中の鉛（II）と発色試液中の TMPyP とキレート錯体を形成させ、可視部の発色を観測することで、鉛（II）の濃度を求めることができます。

【鉛定量の意義】

鉛は酵素中のチオール基と強固に結合し、その活性を阻害します。造血組織においては鉛によるアミノレブリン酸脱水素酵素及び、ヘモグロビン合成の阻害が貧血、ポルフィリン症、神経障害の原因とされています。経口摂取により消化管から吸収された鉛はほとんどが無機物として血中のアルブミンと結合し、一部が赤血球内に侵入しヘモグロビンと結合します。血流を介して全身を巡り、肝臓で解毒され、排泄物として常に体外に排出されるため、その濃度レベルは一定です。しかし、肝臓の解毒能を超える量の過剰な摂取をした場合には中毒症状を発症し、尿中の鉛もそれに応じて増加します。

【キットの内容】

合計　50 測定分（商品コード：PB01M）

A：スピンカラム

		準　備
スピンカラム・廃液用ﾁｭｰﾌﾞ	52 個	そのまま使用して下さい
回収用チューブ	52 個	そのまま使用して下さい
溶出液（1.3M 硝酸）	添付されておりません	1.3M 硝酸水溶液を別途調製してください

B：発色試液

R-A 緩衝液	2.5 mL×1	そのまま使用して下さい
R-B 緩衝液	13.5 mL×1	そのまま使用して下さい
R-R キレート試液	0.25 mL×1	そのまま使用して下さい
鉛標準液 200 μg/dL	20 mL×1	そのまま使用して下さい

【測定試料の注意点】

1）試料を直接アッセイ検体とした場合は溶解性の無機鉛濃度として求められます。全鉛量を求める場合は有機物を分解（酸分解、灰化分解）したものを適用してください。 灰化試料等、高濃度の硝酸、塩酸を含む試料はあらかじめ、pH 2 以上に中和するか、希釈酸の濃度を 0.1M 以下にしてください
2）本法は、その得られる数値を保証するものではありません。応用される際は最適パラメータを試料種ごとに検討の上、ご使用されることをお奨め致します。
3）EDTA は測定値へ影響を与えるため使用しないで下さい。

【オペレーション】

1．試料の調製

更新・最新情報は弊社 website を参照してください。

◇遊離鉛（無機鉛）定量の場合

中性試料（ライセート、生物組織抽出試料、その他）の場合は遠心分離等により懸濁を除去し、試料とする。鉛の解離を促進させる場合は硝酸、酒石酸酸性として、pH2 程度の希酸試料とする。

*析出、沈殿、懸濁がある場合は遠心分離をしてその上清を使用して下さい。
*鉛の解離挙動は試料種により異なるので抽出酸濃度、抽出時間等は試料ごとに最適化されることを推奨しています。

◇全鉛量の定量の場合

混酸分解、マイクロウエーブ分解、灰化分解等により有機物を分解し、分解試料を pH 2 以上に中和するか、あるいは 0.1M 以下の希酸で希釈溶解し試料とする。

*析出、沈殿、懸濁がある場合は遠心分離をしてその上清を使用して下さい。
*有機物の分解が不十分な場合、以後のプロトコルで中間産物による阻害を受ける場合があります。

*パラメータは一例です。試料、目的に合わせて最適化して下さい。

2．測定プロトコール

A：アッセイ検体の調製（ｽﾋﾟﾝｶﾗﾑによる濃縮分離プロトコール）

スピンカラム
①吸　着

以下の用量で試料、標準液、R-B、をｽﾋﾟﾝｶﾗﾑに添加する

	検　体		
μL	試薬ﾌﾞﾗﾝｸ	鉛標準試料	試 料
精製水	300		
鉛標準液		300	
試　料			300
R-B	100	100	100

ｽﾋﾟﾝｶﾗﾑの蓋を閉め数回転倒混和、遠心分離
（3,000～8,000 rpm, 10 min　室温）
廃液用ﾁｭｰﾌﾞに溜まった 400 μL のスルー液を除去

②洗　浄

精製水をｽﾋﾟﾝｶﾗﾑに 400 μL 添加し、同様に遠心分離する
ｽﾋﾟﾝｶﾗﾑを回収用ﾁｭｰﾌﾞに付け替える

③溶　出

溶出液（1.3M 硝酸）をｽﾋﾟﾝｶﾗﾑに 100μL 添加し同様に遠心分離する

回収用ﾁｭｰﾌﾞに溜まった溶出液（スルー液）をアッセイ用検体とする

B：プレートリーダー（紫外可視分光光度計）による定量（1 検体 247 µL 容量）

以下の用量で R-A、R-B、R-R、プロトコル A で調製されたアッセイ用検体を清浄なウエル、セル等へ分注して下さい。

○アッセイ

添加順		(µL)
1	アッセイ検体（プロトコル A） 試薬ﾌﾞﾗﾝｸ、鉛標準試料、試料	25
2	R-A 緩衝液	50
3	R-B 緩衝液	170
4	R-R ｷﾚｰﾄ試液	2
↓ 十分に混合し、室温 5 分後、所定波長の吸光度を測定		

*ピペッティングにより泡が発生しないように丁寧に混合してください。泡が発生した場合はプレートミキサー等により除去してください。プレートミキサーのみによる混合、撹拌では再現性不良が発生する場合があります。
*標準液の濃度はカットオフ値、目的に合わせて、選択してください。
但し 500 µg/dL 以上の試料では 2 倍～10 倍希釈したものをアッセイ検体としてください。
アッセイボリュームを変更する場合は上記割合でアッセイして下さい。

測定条件（マイクロプレートリーダー）

測光波長（主波長）	480 nm (吸収極大波長)
感度のある波長域	476 ～490 nm
測定温度	25～37℃
ウエル	96 穴ウエル or 分光測定用セル等

*紫外可視分光光度計を使用してキュベットで測定する場合、測定可能な検体数はマイクロプレートリーダー使用時と比較して少なくなります。ダウンサイズされた微量セルを使用することで 96 穴ウエルと同等の測定数を得ることも可能です。詳細については、弊社 website のサポート情報「紫外可視分光計　微量セル推奨品」を御参照下さい。微量セルはセルホルダーとのクリアランスの僅差による誤差、再現性の低下などが報告されています。使用時にはセルホルダーへ均一に装着されていることを十分に確認してください。
*タンパク質低吸着タイプのウエルを使用してください。

○濃度の算出

$$\frac{OD_{試料} - OD_{ブランク}}{OD_{標準} - OD_{ブランク}} \times 200 = 鉛濃度(\mu g/dL)$$

標準液濃度

$OD_{試料}$：　試料の吸光度
$OD_{標準}$：　標準試料の吸光度
$OD_{ブランク}$：試薬ブランクの吸光度

*単位換算　µg/dL×0.048 = µmol/L

【主な仕様と性能】

感度	試薬ブランクを対照として鉛標準液（200 µg/dL）を測定した時の⊿OD は 0.1～0.8 の範囲内です。（ｽﾋﾟﾝｶﾗﾑ適用時）
同時再現性	同一検体を 5 回測定した時の CV は 15%以内です。
正確性	原子吸光光度法による測定値の差は 20%以内です。
測定範囲	6～500 µg/dL 試料種により、10 µg/dL 以下の試料測定時に±1 µg/dL の誤差、及び擬陽性として正の誤差を与える場合があります。このレンジにおける数値を検定する場合は事前に試行し、正確性を確認して下さい。
共存物質の参考許容範囲	生理的濃度の Fe, Cu, Zn は測定値に影響を与えません。 Cd は 5 µg/dL まで測定値に影響を与えません。 *生理的濃度を超える過剰なアルカリ土類金属が共存する試料はスピンカラムでの吸着を阻害する可能性があるので、別途、アルカリ土類金属除去能をもつカラムで前処理してください。

【品質保持期限と保存方法】

本品の品質保持期限は製造後 12 ヶ月です。（冷蔵 2～8℃）
開封後、冷暗所（2-8℃）で保存し、1 ヶ月以内に使用して下さい。

【参考文献】

斎藤幹彦，堀口大吉，喜納兼勇，*分析化学*, 30, 635－639（1981）.
S. Igarashi, A. Manaka, M. Terunuma, M. Kaneki, *Analytical Letters*, 36, 11, 2393-2399（2003）

【製造販売業者】

AKJ グローバルテクノロジー 株式会社
千葉市中央区中央 4-5-1　Qiball 14F

※Metallogenics ™およびメタロジェニックス ™は、AKJ グローバルテクノロジー（株）の試薬販売ブランドです。
※メタロアッセイ ™は、AKJ グローバルテクノロジー（株）の 試薬キットの名称です。

問い合わせ先
AKJ グローバルテクノロジー株式会社　営業部
〒260-0013　千葉市中央区中央 4-5-1　Qiball 14F
TEL :　043-227-6767
FAX :　043-227-6768
e-mail :　sales@ak-j.com
URL:　http://ak-j.jp/

※ 取扱説明書、測定プロトコール等、製品に関する最新の情報は、下記弊社 website のサポートコーナーで御確認下さい。
http://ak-j.jp/
※ 本製品は研究用であり、その数値を完全に保証するものではございません。あらかじめご了承下さい。
※ 表記性能は汎用されているマイクロプレートリーダー、紫外可視分光光度計を用いた場合の目安です。使用機器の型式によっては完全に一致しない場合があります。あらかじめご了承下さい。
※ 品質に関してのお問い合わせの際は、試薬キット包装袋に貼付の Lot No.を御確認の上、お問い合わせ下さい。
※ 商品の仕様・サービス・包装形態・梱包形態・測定プロトコールは、予告なく変更する場合があります。本取扱説明書に従い、適切に御使用下さい。
※ 商品の輸送・取扱い・処理・廃棄については、付属の製品安全データシート（MSDS）に従って下さい。